

明 細 書

Slc25a10による肥満治療に有効な化合物の評価方法

技術分野

- [0001] 本発明は、Slc25a10遺伝子又はタンパク質を用いた肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法に関する。また、本発明は、Slc25a10遺伝子又はタンパク質を用いた肥満の検査方法に関する。

背景技術

- [0002] 肥満は、高血圧症、糖尿病、高脂血症、虚血性心疾患等に代表される種々の成人病の危険因子である。また、これらの多くは慢性疾患であることから、将来的には医療費の高騰の原因になると考えられ、社会的にも大きな問題となっている。
- [0003] このような肥満を防止するために抗肥満薬の開発が進められており、現在では、食欲抑制剤や脂質吸収阻害剤が臨床的に利用されている。ここで、抗肥満薬研究の標的分子としては、これまでにレプチン、PPAR γ 、ニューロペプチドY等が知られているが、肥満の原因は非常に多様であるため、創薬標的として作用機序の異なった標的分子が待望されている。
- [0004] また、このような肥満状態あるいはその原因を適切に診断することは、その後の適切な治療にとって不可欠であるため、簡便で精度の高い肥満マーカーの出現が望まれている。また、近年、投与した薬剤の効果が被投与者の遺伝子多型等の遺伝子型に影響を受ける現象が見出されており、薬剤の開発段階における臨床試験やいわゆるオーダーメイド医療において、分子レベルでの検査や診断のマーカーが待望されている。
- [0005] 一方、Slc25a10は、ミトコンドリアの内膜に存在する輸送タンパク質のグループに属する6回膜貫通型のタンパク質であることが知られており、これまでに、ラット及びマウスの遺伝子(GenBank Accession No. NM_013770:配列番号1)のクローニングに関する報告(J. Biol. Chem. 273(38), 24754-24759(1998):非特許文献1)及びヒト遺伝子(GenBank Accession No. NM_012140:配列番号2)のクローニングに関する報告がある(Biochem. J. 344, 953-960

(1999):非特許文献2)。

[0006] 非特許文献2において、マウスを寒冷下に晒した場合に肥満細胞中のSlc25a10の発現量が低下すること、マウス3T3-L1細胞をインシュリン処理した場合にSlc25a10の発現量が低下すること、同細胞を遊離脂肪酸中で培養した場合にSlc25a10の発現量が上昇することが明らかにされている。

[0007] 非特許文献1:Giuseppe Fiermonte, et al., J. Biol. Chem. 273(38), 24754-24759 (1998)

非特許文献2:Kallol Das, et al., Biochem. J. 344, 953-960 (1999)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、Slc25a10と肥満あるいは体重との相関についてはこれまでに何ら知見がなく、体重をコントロールする化合物等についての知見も全くないのが現状であった。

[0009] 本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、肥満の治療薬のスクリーニング等、化合物の評価方法を提供することを目的とする。また、分子レベルで判断可能な肥満の検査方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、Slc25a10遺伝子の発現量と体重との間には一定の相関関係があることを見出すとともに、Slc25a10遺伝子の発現量の変化と脂肪酸合成に関与する分子の発現量の変化との間に相関関係があることを見出し、本発明を完成した。

[0011] すなわち、本発明は、以下の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法(1)及び(2)を提供する。

(1)被検化合物を、被検動物又は被検細胞に、投与又は接触させる工程と、該被検動物又は該被検細胞中でSlc25a10遺伝子あるいは該遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルの変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。

(2)被検化合物を、Slc25a10遺伝子の発現調節領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を有する被検動物又は被検細胞に投与又は接触させる工程と、該レポーター遺伝子の被検動物又は被検細胞中での発現レベルの変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。

[0012] 上記評価方法(1)及び(2)において、前記発現レベルの変化は、発現レベルの低下であることが好ましい。また、ACC1(アセチルCoAカルボキシラーゼ1)発現量、マロニルCoA存在量及び脂肪酸存在量のうち少なくとも一つの変化を検出する工程をさらに含んでもよい。かかる工程を含むことにより、被検対象となった肥満がSlc25a10を介した脂肪酸合成に起因して生じていると判断できる。

[0013] 本発明は、また、以下の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法(3)及び(4)を提供する。

(3)被検化合物を、被検動物又は被検細胞に、投与又は接触させる工程と、該被検化合物が、Slc25a10タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する工程と、を含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。

(4)被検化合物を、Slc25a10タンパク質に接触させる工程と、該被検化合物が、該タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する工程と、を含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。

[0014] 本発明は、また、前述したいずれかの評価方法によって得られた化合物を有効成分として含有することを特徴とする肥満の治療又は予防剤を提供する。

[0015] 本発明は、また、Slc25a10遺伝子の発現量を低下させることを特徴とする脂肪酸合成阻害方法を提供する。ここで、Slc25a10遺伝子の発現量を低下させる手段は特に制限されないが、RNAi(RNA干渉)を利用することが好ましい。Slc25a10のRNAiは、例えば、以下のsiRNA(small interfering RNA)を使用することにより達成される。配列番号3及び4に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号5及び6に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号7及び8に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号9及び10に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号11及び12に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号17及び18に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号21及び22に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号23及び24に記載の核酸からなるsiRNA、配

列番号25及び26に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号27及び28に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号29及び30に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号31及び32に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号35及び36に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号37及び38に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号39及び40に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号41及び42に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号43及び44に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号45及び46に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号47及び48に記載の核酸からなるsiRNA及び配列番号49及び50に記載の核酸からなるsiRNA。特に、配列番号9及び10に記載の核酸からなるsiRNA並びに配列番号41及び42に記載の核酸からなるsiRNAは、Slc25a10遺伝子の発現を強く低下させるため、これらのsiRNAを使用することが好ましい。

[0016] 本発明は、また、Slc25a10遺伝子の発現量を低下させる工程を含むことを特徴とする肥満の治療又は予防方法を提供する。ここで、Slc25a10遺伝子の発現量を低下させる手段は特に制限されないが、RNAiにより抑制することが好ましい。RNAiは、上述のsiRNAを使用することにより達成されるが、特に配列番号9及び10に記載の核酸からなるsiRNA並びに配列番号41及び42に記載の核酸からなるsiRNAを使用することが好ましい。

[0017] 本発明は、また、以下の肥満の検査方法(1)～(5)を提供する。

(1)被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10遺伝子の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする肥満の検査方法。

(2)被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10タンパク質の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする肥満の検査方法。

(3)被検組織又は被検細胞において、Slc25a10遺伝子の発現レベル又はSlc25a10タンパク質の活性を変化させた際に、該変化によって生じる脂肪酸合成に関与する物質の変化量を測定することを特徴とする肥満の検査方法。

(4)被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10遺伝子に存在する多型を検出することを特徴とする肥満の検査方法。

(5)Slc25a10タンパク質と相互作用することにより、Slc25a10遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量又は該タンパク質の活性を検出することを特徴とする

肥満の検査方法。

[0018] 本発明は、さらに、配列番号9及び10に記載の核酸からなることを特徴とするsiRNAを提供し、当該siRNAを含むことを特徴とするSlc25a10発現抑制剤、脂肪合成抑制剤及び肥満の治療又は予防剤を提供する。

[0019] 本発明は、さらに、配列番号41及び42に記載の核酸からなることを特徴とするsiRNAを提供し、当該siRNAを含むことを特徴とするSlc25a10発現抑制剤、脂肪合成抑制剤及び肥満の治療又は予防剤を提供する。

発明の効果

[0020] 本発明の化合物の評価方法又は検査方法によれば、肥満の治療薬のスクリーニング等、化合物の評価方法を提供することが可能となる。また、分子レベルで判断可能な肥満の検査方法を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]図1は、HEK293細胞の顕微鏡写真である。(a)は、CCCPで処理したHEK293細胞を表し、(b)は、CCCP非処理のHEK293細胞を表す。

[図2]図2は、Slc25a10とミトコンドリアプロトン勾配との関係についてフローサイトメーターにより解析した結果を示す図である。(a)はCCCPで処理したHEK293細胞を、(b)は非処理のHEK293細胞を、(c)はSlc25a10を導入したHEK293細胞を表す。

[図3]図3は、Slc25a10とミトコンドリアプロトン勾配との関係についてフルオロメーターにより解析した結果を示すグラフである。

[図4]図4は、各組織におけるSlc25a10遺伝子の発現量を示す図である。

[図5]図5は、脂肪細胞への分化の前後における(a)マウスSlc25a10遺伝子及び(b)ACC1遺伝子の発現量の変化を示すグラフである。

[図6]図6は、様々なsiRNAをトランスフェクトした細胞におけるSlc25a10遺伝子の相対発現量を表すグラフである。(a)はマウスの細胞での結果を、(b)はヒトの細胞での結果を表す。SCRは哺乳類ではRNAiが生じないスクランブルsiRNAをトランスフェクトさせた細胞を表す。

[図7]図7は、siRNA(H4又はH10)をトランスフェクトさせた細胞における(a)Slc25

a10遺伝子及び(b)ACC1遺伝子の発現量を表すグラフである。

[図8]図8は、Slc25a10遺伝子を過剰発現させた細胞におけるACC1遺伝子の発現量を表すグラフである。

[図9]図9は、siRNA(M8)をトランスフェクトさせた細胞におけるマロニルCoAのレベルを表すグラフである。

[図10]図10は、脂肪細胞に分化した3T3-L1細胞の顕微鏡写真である。(a)は分化前の細胞を、(b)は分化後の細胞を、(c)は分化後の細胞をscr-siRNAで処理した細胞を、(d)は分化後の細胞をsiRNA(M8)で処理した細胞を表す。

[図11]図11は、各細胞における脂肪の蓄積量を表すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0022] 以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

[0023] 先ず、本発明にかかる用語について説明する。

[0024] 本発明における「発現レベル」とは、Slc25a10遺伝子の転写産物の絶対量又は相対量をいう。この場合、当該遺伝子は、DNA又はmRNAのいずれをも含む。また、発現の検出対象がタンパク質の場合、その「発現レベル」とは、Slc25a10遺伝子の翻訳産物の絶対量又は相対量をいう。

[0025] また、本発明における「被検動物」としては、その種は特に限定されず、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サルが挙げられる。

[0026] また、本発明における「被検組織」とは、肥満検査を行う際に生体から抽出可能な組織であればその種類は特に限定されないが、肥満の影響が反映されやすいとの観点から、例えば、肝臓組織、脂肪組織、筋肉組織、血液組織であることが好ましい。また、組織の単離が容易であるとの観点から、前記組織の中でも血液組織であることが好ましい。ここで、これらの組織の由来となる動物種については特に制限されないが、本発明の主たる用途がヒトの臨床的使用であることから、ヒトであることが好ましい。

[0027] また、本発明における「被検細胞」についても、肥満の検査を行う際に生体から抽出可能な細胞であれば、その種類は特に限定されないが、肥満の影響が反映されやすいとの観点から、例えば、肝細胞、脂肪細胞(白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞等)

、筋肉細胞(筋芽細胞、骨格筋細胞平滑筋細胞等)、膵細胞(膵島細胞等)、血球細胞であることが好ましい。ここで、かかる組織の由来となる動物種については特に限定されないが、本発明の主たる用途がヒトの臨床的使用であることから、ヒトであることが好ましい。

[0028] さらに、本発明における「肥満」とは、脂肪組織が過剰に蓄積した状態と定義される一般的な肥満に加え、これに糖尿病や高血圧等の合併症又は内臓脂肪が伴う、いわゆる「肥満症」も含む。また、本発明における「肥満」は、薬物投与等による体重のコントロールを受けた場合に、もとの体重と比較して相対的に体重が増加した状態をも意味する。

[0029] また、本発明における「検査」とは、肥満であることを単に判断するのみならず、将来的な肥満を予測する場合をも含む。

[0030] 次に、本発明にかかるSlc25a10について説明する。Slc25a10は褐色脂肪細胞のミトコンドリアに存在し、熱産生に関与するUCPファミリーと36〜38%程度の相同性を有する。UCPは、ミトコンドリアにおいて熱の産生を引き起こすタンパク質である。具体的には、グルコースや脂肪酸が酸化されることによって生じたプロトンが、呼吸鎖酵素群によってミトコンドリア内膜から膜外に放出され、その結果、プロトン勾配が生じる。UCPは、プロトンを内膜内に運ぶチャネルとして機能し、かかるプロトン勾配を解消する。その結果、内膜内のプロトンによって脂肪酸等の酸化が亢進し、熱産生を促す。すなわち、UCPは、生体内のエネルギーの消費を促進する機能を有している。

[0031] 本発明者らは、上述のSlc25a10とUCPとの相同性の高さに反して、Slc25a10がミトコンドリアにおける熱産生においてUCPとは逆の活性を有することを見出した。すなわち、Slc25a10は、ミトコンドリア内膜に存在し、内膜の内外間のプロトン勾配を上昇せしめる活性を有し、その結果、熱産生をせずにエネルギーを蓄積する機能を有する。従って、Slc25a10の機能を阻害することによりエネルギー消費が亢進され、肥満の解消に寄与するものと、本発明者らは考えている。

[0032] 一方、本発明者らは、Slc25a10遺伝子の発現量の変化と脂肪酸合成に関与する分子の発現量の変化との間に相関関係があることを見出した。すなわち、Slc25a1

0遺伝子の発現量を抑制した場合に脂肪酸合成に関与する遺伝子であるACC1(アセチルCoAカルボキシラーゼ1)の発現量や、脂肪酸の前駆物質であるマロニルCoAの量が減少し、一方、Slc25a10遺伝子の発現量を増加させた場合に増加する。これは、Slc25a10が脂肪酸の合成経路上に存在する、あるいは、当該合成経路に深く関与する分子であることを証明するものである。また、脂肪酸は脂質の構成成分であり、体内では、脂肪組織に入った遊離脂肪酸がトリアシルグリセロールに変化し、脂肪細胞に貯蔵される。すなわち、脂肪酸の合成を阻害することができればトリアシルグリセロールの脂肪細胞への貯蔵を阻害できる。Slc25a10や当該合成経路に関与する遺伝子又は分子は、その発現量を低下させることにより脂肪酸の合成能を低下させることができるため、当該遺伝子又は分子の挙動(発現量や活性など)を指標に、肥満に有効な化合物の評価や選択が可能となる。

[0033] (1) 肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法

本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法について説明する。被検化合物を被検動物や被検細胞に投与、接触させることにより変動するSlc25a10遺伝子の発現量を測定したり、被検化合物をSlc25a10タンパク質に接触させて当該タンパク質の活性に及ぼす影響を検討したりすることにより、当該被検化合物の評価を行うことが可能となる。

[0034] すなわち、このような被検化合物の中には、細胞や組織に作用することにより、Slc25a10遺伝子の発現レベルやSlc25a10タンパク質の活性を正常化あるいはコントロールし、脂肪の蓄積や食欲のコントロール等、肥満の原因となるメカニズムの正常化を図ることができるものがあると考えられる。従って、以下に説明するような評価方法により、肥満の治療薬又は予防に有効な化合物を評価することが可能となる。

[0035] (A) Slc25a10遺伝子の発現レベル調節能を指標とする評価方法

Slc25a10遺伝子の発現レベル調節能を指標とする第1の評価方法として、被検化合物を被検動物又は被検細胞に投与又は接触させ、当該被検化合物が被検動物又は被検細胞中でSlc25a10遺伝子あるいは当該遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルを調節するか否かを確認する方法が挙げられる。本方法により、肥満の治療又は予防に有効な化合物を評価することが可能となる。

- [0036] 具体的には、以下の手順で被検化合物の評価を行う。まず、被検化合物を被検動物又は被検細胞に投与又は接触させる。ここで、被検化合物としては、肥満の治療又は予防薬の候補化合物であれば、その構造や性質は問わず、化合物種も限定されない。被検化合物を被検動物に投与する方法としては特に制限はなく、具体的には、例えば、経口投与、非経口投与（例えば、経皮投与、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射）が挙げられる。また、被検化合物を被検細胞に接触させる方法としても特に制限はなく、具体的には、例えば、培養液や緩衝液（リン酸緩衝液等）等の溶液中で混合し両者を接触させる方法が挙げられる。
- [0037] 次に、被検化合物が被検動物又は被検細胞中でSlc25a10遺伝子あるいは当該遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルを調節するか否かを確認する。
- [0038] 前記遺伝子の発現レベルの調節の有無の確認法としては、特に制限はなく、前述の投与又は接触の前を対照とし、当該遺伝子の発現量の変化をRT-PCRのような遺伝子増幅法、DNAマイクロアレイを用いる方法又はノーザンハイブリダイゼーション法等によって検出・比較することにより実施することができる。また、前記遺伝子の発現調節領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を人為的に導入した動物又は細胞を用いてもよい。この場合、レポーター遺伝子としては、具体的には、例えば、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子又はグリーンフルオレッセンスプロテイン遺伝子が挙げられる。
- [0039] ここで、「Slc25a10遺伝子と機能的に等価な遺伝子」とは、Slc25a10遺伝子と塩基配列は異なるものの、比較的高い相同性を示し、Slc25a10と同じ又は類似の活性を有する遺伝子を示す。ここで、前記相同性は、機能的に等価であれば特に制限はないが、塩基配列の相同性が70〜100%であることが好ましく、80〜100%であることがより好ましく、90〜100%であることが特に好ましい。相同性が前記下限より低い場合には、Slc25a10と同じ又は類似の機能を示さない可能性が高い傾向にある。しかしながら、塩基配列の相同性が前記下限未満であっても、Slc25a10に特有の機能を有するドメインと、当該ドメインに対応する塩基配列との相同性が高い場合にはSlc25a10遺伝子と同様又は類似の機能を有する場合がある。このような遺伝子は、塩基配列の相同性が前記範囲外であっても好適に使用可能である。また、比

較的相同性の高い遺伝子とは、Slc25a10遺伝子における1又は2以上の塩基が自然若しくは人工的に置換、欠失、不可及び／又は挿入した遺伝子であってもよい。

- [0040] 被検化合物を投与又は接触させない場合に比べて、被検化合物を投与又は接触させた場合のSlc25a10遺伝子又はSlc25a10遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルが30%以上、好ましくは50%以上低下した場合、当該被検化合物は肥満の治療又は予防に有効な化合物と評価できる。
- [0041] また、Slc25a10遺伝子の発現レベル調節能を指標とする第2の評価方法として、被検化合物を、被検動物又は被検細胞に、投与又は接触させ、当該被検動物又は被検細胞中でSlc25a10遺伝子あるいは当該遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルの変化を検出する方法が挙げられる。発現レベルの調節の有無のみならず、発現レベルの変化の程度を検出することにより、被検化合物の活性の強弱をも考慮した評価が可能となる。また、上述のように、Slc25a10遺伝子の発現レベルが低下すると、例えばACC1やマロニルCoAといった脂肪酸合成経路上の分子の発現量や存在量が低下し、結果的に脂肪酸の合成量が減少する。従って、脂肪酸合成能を低下せしめる化合物のスクリーニング等を行う場合には、前記第2の評価方法によって、Slc25a10遺伝子あるいは当該遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルの低下を指標に評価を行うことが好ましい。
- [0042] 前記遺伝子の発現レベルの変化を検出する方法としては、特に制限はなく、前述の投与又は接触の前を対照とし、当該遺伝子の発現量の変化をRT-PCRのような遺伝子増幅法、DNAマイクロアレイを用いる方法又はノーザンハイブリダイゼーション法等によって検出・定量することにより実施することができる。また、前記遺伝子の発現調節領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を人為的に導入した動物又は細胞を用いてもよい。この場合、レポーター遺伝子としては、具体的には、例えば、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子又はグリーンフルオレッセンスプロテイン遺伝子が挙げられる。
- [0043] 被検化合物を投与又は接触させない場合に比べて、被検化合物を投与又は接触させた場合のSlc25a10遺伝子又はSlc25a10遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルが30%以上、好ましくは50%以上低下した場合、当該被検化合物は肥

満の治療又は予防に有効な化合物と評価できる。

- [0044] また、前記第2の方法に加えて、Slc25a10遺伝子の発現レベルの変化に伴って生じる、ACC1の発現量、マロニルCoA存在量及び脂肪酸存在量のうち少なくとも一つの変化を検出する工程を含んでいてもよい。ここで、前記ACC1は、ACC1タンパク質及び遺伝子のいずれであってもよい。
- [0045] ACC1タンパク質や遺伝子の発現量の変化を検出する方法としては、特に制限はないが、例えば、ウエスタンブロッティング、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法、DNAチップ、RT-PCRが挙げられる。また、マロニルCoAの存在量の変化を検出する方法としては、特に制限はないが、例えば、逆相クロマトグラフィー等で部分精製した細胞由来のマロニルCoAを脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase) 及び放射線標識したアセチルCoAと反応させ、生成された標識脂肪酸量を測定する方法が挙げられる。
- [0046] 被検化合物を投与又は接触させない場合に比べて、被検化合物を投与又は接触させた場合のACC1遺伝子若しくはACC1タンパク質の発現量又はマロニルCoA若しくは脂肪酸の存在量が5%以上、好ましくは10%以上低下した場合、当該被検化合物は肥満の治療又は予防に有効な化合物と評価できる。
- [0047] このように、Slc25a10遺伝子の発現量及びACC1、マロニルCoA、脂肪酸の発現量や存在量を指標として化合物の評価を行うことにより、脂肪酸合成経路に直接作用する被検化合物の評価が可能となる。
- [0048] (B) Slc25a10タンパク質の活性を指標とする評価方法
被検化合物を被検動物、被検細胞又はSlc25a10タンパク質に接触させ、被検化合物が当該タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認することにより、肥満の治療又は予防に有効な化合物を評価することが可能となる。
- [0049] 具体的には、以下の手順で被検化合物の評価を行う。まず、被検動物、被検細胞又は被検化合物をSlc25a10タンパク質に接触させる。ここで、被検化合物としては、肥満の治療又は予防薬の候補化合物であれば、その構造や性質は問わず、化合物種も限定されない。被検化合物を被検動物に投与する方法としては特に制限はなく、具体的には、例えば、経口投与、非経口投与(例えば、経皮投与、筋肉内注射、

静脈内注射、皮下注射)が挙げられる。また、被検化合物を被検細胞に接触させる方法としても特に制限はなく、具体的には、例えば、培養液や緩衝液(リン酸緩衝液等)等の溶液中で混合し両者を接触させる方法が挙げられる。また、タンパク質と被検化合物を接触させる方法としては、特に制限はなく、具体的には、例えば、緩衝液(リン酸緩衝液等)等の溶液中で混合し接触させる方法が挙げられる。

[0050] 次に、被検化合物が当該タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する。タンパク質の活性測定における条件は、使用するタンパク質の性質により適宜設定すればよい。このような条件としては、具体的には、例えば、Slc25a10タンパク質の場合には、ミトコンドリア内膜の内外間のプロトン勾配の変化等を指標とすることができる(例えば、Yu XX et al, Biochem. J (2001) 353, 369-375参照)。

[0051] 被検化合物を投与又は接触させない場合に比べて、被検化合物を投与又は接触させた場合のSlc25a10タンパク質の活性が30%以上、好ましくは50%以上低下した場合、当該被検化合物は肥満の治療又は予防に有効な化合物と評価できる。

[0052] 以上説明したような本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法により、肥満の治療薬や診断薬のスクリーニングや、これらの薬剤の有効性又は安全性の評価、さらには、オーダーメイド治療における適切な薬剤の選択が可能となる。

[0053] (2) 肥満の検査方法

次に本発明の肥満の検査方法について説明する。

[0054] (A) Slc25a10遺伝子の発現レベルを測定することによる肥満の検査方法

被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10遺伝子の発現レベルの変化を検出することにより、又は、発現レベルを測定することにより、当該被検組織又は被検細胞を抽出した生体(例えばヒト)が肥満であるか否かを検査・診断することが可能である。また、単に検査時の肥満の状態を検査するのみならず、将来的に肥満になるか否かを予測することも可能である。

[0055] 以下に、本発明の検査の具体的な方法について説明する。まず、検査対象となる生体より被検組織又は被検細胞を抽出する。このような抽出の方法としては特に制限はなく、公知の方法により抽出することができる。

[0056] 次に、抽出された被検組織又は被検細胞から発現レベルの測定の対象となる遺伝

子を調製する。Slc25a10遺伝子の発現レベルを測定するには、先ず、被検組織又は被検細胞からSlc25a10のRNA(total RNA又はmRNA)を調製する必要がある。このようなRNAの調製は、公知の方法によって行うことができるが、例えば、Molecular cloning A LABORATORY MANUAL 2nd EDITION (1989) (T. Maniatis著:Cold Spring Harbor Laboratory Press) 7. 3-7. 36を参照して行うことができる。こうして調製したRNAを用いて、例えば、RT-PCRのような遺伝子増幅法、DNAマイクロアレイ(例えば、Affymetrix社製DNAチップ)を用いる方法、ノーザンハイブリダイゼーション法により、その発現量を測定することができる。また、被検組織又は被検細胞を用いたイン サイチュ ハイブリダイゼーション(in situ hybridization)等により、その発現量を測定することもできる。

[0057] また、Slc25a10遺伝子の発現レベルの変化を検出するには、前記の発現量の測定を当該発現量が増加すると予測される期間の前後(例えば、肥満治療薬の投与の前後)について行い、発現量の差を測定すればよい。具体的には、被検組織又は被検細胞において、前述したSlc25a10遺伝子の発現量が増加すると予測される期間の前後で、その発現レベルが有意に上昇した場合に、体重の増加があった又は将来的に増加する可能性があるとは診断できる。一方、前記発現レベルが減少した場合に体重の減少があった又は将来的に減少する可能性があるとは診断できる。

[0058] (B) Slc25a10タンパク質の発現レベルを測定することによる肥満の検査方法

被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10タンパク質の発現レベルの変化を検出することにより、又は、発現レベルを測定することにより、当該被検組織又は被検細胞を抽出した生体(例えばヒト)が肥満であるか否かを検査・診断することが可能である。また、単に検査時の肥満状態を検査するのみならず、将来的に肥満又は痩せになりうるかを予測することも可能である。

[0059] 以下、このような検査の具体的な方法について説明する。タンパク質の発現レベルを測定する方法としては、生体から単離したタンパク質を定量する方法やタンパク質の血中濃度を測定する方法があり、具体的な方法としては特に限定されない。生体から単離したタンパク質を定量する方法の具体例としては、以下のとおりである。先ず、被検組織又は被検細胞からSlc25a10タンパク質を調製する。このようなタンパク質

の調製は、公知の方法によって行うことができる。こうして調製したタンパク質から、例えば、プロテインチップ(例えば、CIPHERGEN社製プロテインチップシステム)を用いる方法、免疫学的方法(例えば、ELISA、EIA法、ウェスタンブロッティング法)により、その発現量を測定することができる。また、被検組織又は被検細胞を用いた免疫染色等によって、その発現量を測定することもできる。一方、タンパク質の血中濃度を測定する方法の具体例としては、生体から採取した血液を用いて、上記免疫学的方法等により、Slc25a10タンパク質を定量する方法が挙げられる。

[0060] 以上のようにして、Slc25a10の遺伝子又はタンパク質の発現レベルを測定した後、その結果を解析することにより、被検体が肥満か又は痩せであるかを検査できる。すなわち、本発明より、Slc25a10タンパク質の発現レベルと体重は一定の相関関係を有することが明らかにしたため、上記検査結果と対照群(健常人等)におけるSlc25a10タンパク質の発現量とを比較することにより、肥満の程度を判断することが可能となる。また、本発明の検査方法によれば、単に検査時の肥満の状態を検査するのみならず、将来的な肥満又は痩せの可能性の予測も可能となる。

[0061] また、Slc25a10タンパク質の発現レベルの変化を検出するには、前記の発現量の測定を当該発現量が増加すると予測される期間の前後(例えば、肥満治療薬の投与の前後)について行い、発現量の差を測定すればよい。具体的には、被検組織又は被検細胞において、前述したSlc25a10タンパク質の発現量が増加すると予測される期間の前後で、その発現レベルが有意に上昇した場合に体重の増加があった又は将来的に増加する可能性があるとして診断できる。

[0062] (C) Slc25a10及び脂肪酸合成経路に関与する分子の相互作用に基づく肥満の検査方法

生体内において、Slc25a10遺伝子・タンパク質は、他の多くの分子と直接的又は間接的に相互作用して固有の機能を発揮している。例えば、本発明者らは、Slc25a10遺伝子の発現量と脂肪酸合成経路上の種々の分子(例えば、ACC1やマロニルCoA)の変化量との間に相関があり、Slc25a10遺伝子の発現が増加することにより、脂肪酸合成経路上の分子の発現が増加すること、及び、Slc25a10遺伝子の発現が低下することにより、脂肪酸合成経路上の分子の発現が低下することを見出してい

る。これは、Slc25a10遺伝子・タンパク質の発現量を測定することにより、脂肪酸合成経路の活性化状態を検出することができることを意味する。その結果、脂肪酸合成の促進に起因する脂肪の蓄積を予測・検査することが可能となる。

[0063] ここで、脂肪酸合成経路上の種々の分子の発現を検出する方法としては、特に制限はなく、遺伝子(例えば、ACC1)であれば、ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCRにより検出すればよく、マロニルCoAであれば、マロニルCoAを基質として脂肪酸合成反応をさせ、放射性同位体の取り込み量等を指標にマロニルCoAの量を算出することができる。

[0064] このようにして検出された脂肪酸合成経路上の分子の変化量より、標準体重又は健康人における当該分子の発現量又は量と比較して、変化量が有意に上昇した場合に体重の増加があった又は将来的に増加する可能性があるとは診断できる。一方、前記変化量が減少した場合に体重の減少があった又は将来的に減少する可能性があるとは診断できる。

[0065] またSlc25a10の発現のみならず、Slc25a10タンパク質の活性を変化させた際に、これによって生じる脂肪酸合成経路上の分子の変化量を検出することにより、肥満の検査をすることもできる。

[0066] (D) Slc25a10遺伝子の遺伝的多型を検出する肥満の検査方法

Slc25a10遺伝子に遺伝的多型が存在する場合、その多型の有無や種類によりSlc25a10遺伝子又はタンパク質の発現レベルが変化したり、当該タンパク質の活性に異常が生じたりする場合がある。従って、このような遺伝的多型を検出することによりSlc25a10の発現や活性に関する知見を得、さらに、被検組織や被検細胞の由来となった被検体の肥満の検査を行うことができる。このような遺伝的多型としては、具体的には、例えば、ミニサテライト、マイクロサテライト、SNP(single nucleotide polymorphism:一塩基多型)が挙げられる。

[0067] Slc25a10遺伝子における多型の検出は以下のようにして行うことができる。すなわち、Slc25a10遺伝子において、その発現量を制御する領域を検査対象となる肥満の被検体を対象として塩基配列を決定し、多型部位を検出する。検出された多型部位の対立遺伝子頻度を算出し、被検体集団において有意に増加又は減少している

対立遺伝子を見出すことにより肥満と相関する多型を同定する。このようにして検出された遺伝的多型は、例えば、被検体由来のゲノムDNAについて、多型部位の塩基配列の解析、多型部位に存在する塩基の種類に依存して変化するDNAの物理化学的性質の差や制限酵素部位の相違を利用する方法、当該多型部位の検出に適当な検出用プローブを利用する方法及び質量分析法を利用した方法等によって臨床的に検出可能である。

[0068] (E) Slc25a10タンパク質と相互作用することによりSlc25a10遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量又は活性を検出することによる肥満の検査方法

[0069] 生体内において、多くのタンパク質は他のタンパク質と相互作用することにより、所定の生理機能を発揮する。Slc25a10についても同様に、例えば、その発現を制御する転写因子等の作用を受けることにより発現量が制御され、所定の機能を発揮している。Slc25a10タンパク質と、当該Slc25a10タンパク質と相互作用することによりSlc25a10遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量やその活性とは一定の相関関係を有し、いずれか一方の挙動を検出することにより、他方の挙動を推測できる関係にある。

[0070] ここで、「相互作用」とは、Slc25a10タンパク質と別のタンパク質が直接的又は間接的に作用することをいい、例えば、Slc25a10タンパク質が別のタンパク質と物理的に接触することによりアミノ酸の修飾等を生じるような作用や、第3のタンパク質を介して相互作用し、間接的にSlc25a10タンパク質の発現に影響を及ぼすような作用が挙げられる。このようなタンパク質としては、例えば、Slc25a10タンパク質を介するシグナル伝達において、Slc25a10タンパク質の上流又は下流で生理的機能を発揮するタンパク質が挙げられる。また、このようなタンパク質の発現量又は活性を検出する方法としては、対象となるタンパク質の種類に応じて好適な手段を適宜選択すればよく、具体的な手段としては特に限定されない。

[0071] 以上の(A)～(E)で説明したような本発明の肥満の検査方法によって、分子レベルで肥満又は痩せの診断が可能となるばかりか、将来的に肥満又は痩せになる可能性についても予測できることとなり、従来の診断方法と比較して、よりの確な診断が可能となる。

[0072] (3) 肥満又は痩せの治療、予防剤

Slc25a10遺伝子は、その発現量と体重とが相関関係を示す。また、上述したように、当該遺伝子は、脂肪酸の合成に関与し、当該遺伝子の発現が増加すると脂肪酸の合成は促進される関係にある。従って、当該遺伝子の発現レベルを正常レベルへと調節する化合物は肥満の治療又は予防に有用であるのみならず、例えば、痩せ、糖尿病、高血圧症、高脂血症、虚血性心疾患にも応用可能である。また、Slc25a10遺伝子の発現を阻害することにより脂肪酸の合成は阻害されることから、Slc25a10遺伝子の発現を阻害するか又はSlc25a10タンパク質の活性を低下させる化合物は、脂肪酸合成阻害剤として機能する。このような化合物としては、上述したような本発明の化合物の評価方法によって選択された化合物が挙げられる。これらの化合物を薬剤として使用するには、当該化合物を直接患者へ投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与することもできる。製剤化するに際し、薬理学上許容される担体若しくは媒体としては、具体的には、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定化剤、結合剤、滑沢剤、甘味料、香料又は着色剤が挙げられる。また、このような医薬組成物を患者に投与する方法としては、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の他、鼻腔内の、経気管支的、筋肉的又は経口的な投与が挙げられる。医薬組成物の投与量は、患者の体重、年齢又は投与方法等により変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

[0073] (4) 肥満又は痩せの検査薬、検査キット

Slc25a10タンパク質の発現量は、肥満又は痩せに基づく体重変化と相関関係を有する。従って、当該タンパク質に対する抗体を使用して被検細胞や被検組織中のタンパク質量を検出、測定することにより、肥満又は痩せの検査を簡便に行うことができる。ここで、「抗体」とは、抗原であるSlc25a10遺伝子産物に結合しうる抗体分子全体又はその断片をいう。このような抗体は、公知の方法によって製造することができ、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよい。また、当該抗体を用いた免疫学的測定法としては、公知の方法を使用すればよく、具体的には、例えば、蛍光抗体法、酵素抗体法が挙げられる。

- [0074] また、このような抗体を含んだキットを製造し、本発明を実施することも可能である。キットの構成としては、当該抗体に加え、例えば、抗体を検出するために蛍光標識やラジオアイソトープで標識された2次抗体や抗原抗体反応を行う際に使用する緩衝液を備えていてもよい。
- [0075] このような肥満又は痩せの検査薬を使用することにより、分子レベルでの診断が可能となるばかりか、将来的に肥満又は痩せになる可能性についても予測できることとなり、従来の診断方法と比較して、よりの確な診断が可能となる。また、本発明の肥満又は痩せの検査キットを使用することにより、前述したような的確な診断を非常に簡便に実施することが可能となる。
- [0076] (5)脂肪酸合成阻害方法及び肥満の治療又は予防方法
次に、本発明の脂肪酸合成阻害方法及び肥満の治療又は予防方法について説明する。既に述べたように、本発明者らは、Slc25a10遺伝子の発現を抑制した場合に脂肪酸合成に関与する遺伝子であるACC1の発現量や、脂肪酸の前駆物質であるマロニルCoAの量が減少することを見出した。したがって、Slc25a10遺伝子の発現量を低下させることにより、脂肪酸合成を阻害することか可能となり、ひいては、脂肪の合成を阻害することも可能である。
- [0077] 具体的には、以下の手順で脂肪酸合成阻害を行う。まず、Slc25a10の発現量を低下させる物質を選択する。かかる物質としては、例えば、Slc25a10阻害剤として機能する化合物、Slc25a10の抗体、アンチセンスヌクレオチド及びRNAiに使用するsiRNAが挙げられる。
- [0078] 次に、Slc25a10が存在する個体、組織、細胞に対して前記の物質を導入する。具体的には、対象が個体であれば、導入方法としては特に制限はないが、前記化合物等を、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の他、鼻腔内的、経気管支的、筋肉的又は経口的に導入する方法が挙げられる。また、対象が組織であれば、導入方法としては特に制限はないが、組織中への注入、緩衝液中での混合により導入する方法が挙げられる。さらに、対象が細胞であれば、導入方法としては特に制限はないが、緩衝液中での混合、エレクトロポレーション等が挙げられる。
- [0079] より具体的には、RNAiの場合、例えば、リポソームに封入したsiRNAを細胞培養

液に添加し細胞に接触させることで細胞内にsiRNAを導入でき、RNAiを起こすことができる(Nature, 411, 494-498 (2001)、J. Cell Sci., 114(Pt 24), 4557-4565 (2001)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 301(3), 804-809, 2003)。Slc25a10のRNAiには、以下のsiRNAを用いることができる:H1(配列番号3及び4)、H2(配列番号5及び6)、H3(配列番号7及び8)、H4(配列番号9及び10)、H5(配列番号11及び12)、H8(配列番号17及び18)、H10(配列番号21及び22)、H11(配列番号23及び24)、H12(配列番号25及び26)、M1(配列番号27及び28)、M2(配列番号29及び30)、M3(配列番号31及び32)、M5(配列番号35及び36)、M6(配列番号37及び38)、M7(配列番号39及び40)、M8(配列番号41及び42)、M9(配列番号43及び44)、M10(配列番号45及び46)、M11(配列番号47及び48)及びM12(配列番号49及び50)。これらのsiRNAを複数組み合わせることで使用することによりRNAiを生じさせてもよい。これらの中でも、H4及びM8はSlc25a10の発現抑制作用が特に強いので、Slc25a10のRNAiに適している。

[0080] このようにSlc25a10の発現量を低下させることにより、脂肪酸の合成が阻害される。

[0081] また、かかる脂肪酸合成阻害方法を肥満の治療又は予防に応用することができる。すなわち、生体内でSlc25a10の発現量を低下させることにより脂肪酸の合成を阻害し、結果的に脂質の合成を抑制することにより肥満の治療又は予防が可能となる。

[0082] 具体的には、以下の手順で肥満の治療又は予防を行う。まず、Slc25a10の発現量を低下させる物質を選択する。かかる物質としては、例えば、Slc25a10阻害剤として機能する化合物、Slc25a10の抗体、アンチセンスヌクレオチド及びRNAiに使用するsiRNAが挙げられる。

[0083] 次に、このような物質を生体内に投与する。投与方法としては、特に制限はないが、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の他、鼻腔内の、経気管支的、筋肉の又は経口的な投与方法が挙げられる。RNAiを用いた具体的な方法については、脂肪酸合成阻害方法で説明した通りである。

[0084] (6)配列番号9及び10の核酸からなるsiRNA及びそれを含むSlc25a10発現抑制

剤、脂肪酸合成抑制剤、肥満の治療又は予防剤

既に述べたように、配列番号9及び10の核酸からなるsiRNAは、Slc25a10の発現を強く抑制する。したがって、このsiRNAはSlc25a10発現抑制剤として用いることができ、また、脂肪酸合成抑制剤として用いることもでき、さらに、肥満の治療又は予防剤として用いることも可能である。

- [0085] (7)配列番号41及び42の核酸からなるsiRNA及びそれを含むSlc25a10発現抑制剤、脂肪酸合成抑制剤、肥満の治療又は予防剤

既に述べたように、配列番号41及び42の核酸からなるsiRNAは、Slc25a10の発現を強く抑制する。したがって、このsiRNAはSlc25a10発現抑制剤として用いることができ、また、脂肪酸合成抑制剤として用いることもでき、さらに、肥満の治療又は予防剤として用いることも可能である。

実施例

- [0086] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

- [0087] (肥満モデル動物の作製)

製造例1:ニューロペプチドY(Neuropeptide Y:NPY)Y5アゴニストi. c. v. 投与マウス)

- [0088] NPY Y5アゴニストを投与することにより肥満を呈するモデルマウスを以下の要領で作製した。9〜12週齢の雄マウス(C57BL/6J:クレア社製)を、室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ の条件下、1プラスチックゲージに1匹ずつ飼育した。また、飼育時の明暗のサイクルは12時間とし、午前7時に点灯し、午後7時に消灯した。また、マウスには、飼料(CE-2(タンパク質:25.4重量%、炭水化物:50.3重量%、脂質:4.4重量%):クレア社製)と水を自由に摂取させた。

- [0089] マウスを 80mg/kg ペントバルビタールナトリウム(ダイナボット社製)で麻酔し、滅菌された28ゲージの脳注入カニューレ(アルゼ(Alzet)社製)を右側脳質へ定位的に移植した。カニューレを、ブレグマより後方へ 0.4mm 、側方へ 0.8mm 、深さ 2mm の位置に、頭蓋骨に対し垂直に歯科用セメントで固定した。カニューレを、 0.05% ウシ血清アルブミン(BSA)を含む 10mM のリン酸緩衝液で満たした浸透圧ポンプ(

モデルナンバー2002:アルゼ社製)にポリビニルクロライドチューブで接続した。10 mM PBS(0.05% BSA含む)にD- $\text{Try}^{34}\text{NPY}$ (5マイクログラム/日になるように調製)を溶解した溶液をポンプに満たした後、マウスの背中の皮下に埋め込み連続注入した。また、抗生物質(50mg/kgのセファメジン(Cefamedine):藤沢薬品製)を皮下注射した。

[0090] これらのマウスを、溶媒のみを注入し通常に摂食させたグループ(vehicle group)、D- $\text{Try}^{34}\text{NPY}$ (NPY Y5アゴニスト)を注入することによって摂食量を増加させ肥満にさせたグループ(ad lib fed group)、D- $\text{Try}^{34}\text{NPY}$ を注入したが摂食量はvehicle groupと同量に摂食制限をかけたグループ(pair-fed group)に分けた。

[0091] 製造例2:MCH投与マウス

MCH(melanin-concentrating hormone)を投与することにより肥満を呈するモデルマウスを以下の要領で作製した。13週齢の雄マウス(C57BL/6J:クレア社製)を、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ の条件下、1プラスチックゲージに1匹ずつ飼育した。また、飼育時の明暗のサイクルは12時間とし、午前7時に点灯し、午後7時に消灯した。また、マウスには、飼料(CE-2(タンパク質:25.4重量%、炭水化物:50.3重量%、脂質:4.4重量%):クレア社製)と水は自由に摂取させた。マウスが環境に適応した頃、飼料としてMHF(タンパク質:15.0重量%、炭水化物:52.4重量%、脂質:32.6重量%、オリエンタルバイオサービス社製)を与えた。

[0092] マウスを80mg/kgペントバルビタールナトリウム(ダイナボット社製)で麻酔し、滅菌された28ゲージの脳注入カニューレ(アルゼ(Alzet)社製)を右側脳質へ定位的に移植した。カニューレはブレグマより後方へ0.4mm、側方へ0.8mm、深さ2mmの位置に、頭蓋骨に対し垂直に歯科用セメントで固定した。カニューレを、30%プロピレングリコールで満たした浸透圧ポンプ(モデルナンバー2002:アルゼ社製)にポリビニルクロライドチューブで接続した。ポンプはマウスの背中の皮下に埋め込み、抗生物質を皮下注射した。

[0093] これらのマウスを、平均体重を一致させた3つのグループ(溶媒のみを注入したグループ(vehicle group)、MCHを注入したグループ(ad lib fed group)、MCHを注入しペアフィードとしたグループ(pair-fed group))に分けた。続いて、エーテル

麻酔下で、ポンプをMCH(3マイクログラム/日)又は溶媒(30%プロピレングリコール)に置き換えた。

[0094] 製造例3:DIO(Diet induced obesity)マウス

18週齢のマウス(C57BL/6J:クレア社製)を、室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ の条件下、1プラスチックゲージに1匹ずつ飼育した。このマウスに高カロリー食であるMHF(タンパク質:18.2重量%、炭水化物:55.6重量%、脂質:15.5重量%)を6ヶ月間に渡って与え、肥満を呈するモデルマウス(DIOマウス)を作製した。なお、実施例中、「established MFD」は、これ以上体重が増えないようになるまでMHFを与えて飼育したマウスを指す。

[0095] また、前記のマウスにMHFよりさらに高い脂肪を含有する高カロリー食であるHFD(タンパク質:20.8重量%、炭水化物:38.59重量%、脂質:32.88重量%)を与えたDIOマウス(HFD)も作製した。

[0096] 製造例4:食事制限をしたマウス

マウス(C57BL/6N、17週齢)を1ケージに1匹ずつ個別に飼育した。また、エサは普通食(CA-1、CLEA)を与えた。摂食制限は、以下のようなスケジュールで行った。すなわち、エサ(CA-1)を1日につき3時間(10:00-13:00)だけ与え、水は自由に摂取できるようにした。摂食時間の前後で餌の重量を測定し、その差を摂食量とした。また、摂食制限をしている期間は、体重、外見の観察等をモニターした。なお、条件付けに失敗したと思われるマウス(短期間に極度な体重減少(例えば20%程度の減少)が見られるマウス)は実験には使用しなかった。かかる条件下でマウスを7日間飼育した後、白色脂肪細胞を摘出した。

[0097] 実施例1-5及び比較例1-2:白色脂肪細胞におけるSlc25a10の発現

製造例1-4において製造したモデルマウスを用いて、白色脂肪細胞(WAT)中のSlc25a10遺伝子の発現量を測定した。発現量の測定は、各モデルマウスの白色脂肪細胞から抽出したRNAを、mouse U74Aチップ(Affymetrix社製)及びmouse 25K1.8チップ(Rossetta社製)を用いて処理することにより行った。

[0098] 非処理のC57BL/6Nの白色脂肪細胞におけるSlc25a10の発現量を1とした場合の、DIOマウス(DIO)、D- Try^{34} NPY投与マウス(NPY(FF))、D- Try^{34} NPY

pair feeding投与群マウス(NPY(PF))、MCH投与マウス(MCH(FF))、MCH pair feeding投与群マウス(MCH(PF))、食事制限をしたマウス(Fasting)及び NPY Y5アンタゴニスト投与マウス(Y5ant)におけるSlc25a10遺伝子の発現量を表1に示す。

[0099] 表1より明らかなように、肥満モデルマウスではSlc25a10の発現量が増加し、食事制限をしたマウス及びNPY Y5アンタゴニストを投与したマウスでは、その発現量が低下していた。従って、NPY Y5アンタゴニストの発現量と体重とが相関関係を有していることが明らかとなった。

[0100] [表1]

	肥 満 モ デ ル	Slc25a10 の 発 現 量
実 施 例 1	DIO マウス	1.9
実 施 例 2	NPY(PF)	1.9
実 施 例 3	NPY(FF)	3.0
実 施 例 4	MCH(PF)	2.4
実 施 例 5	MCH(FF)	1.7
比 較 例 1	Fasting	0.2
比 較 例 2	Y5 antagonist	0.77

[0101] 実施例6:Slc25a10とミトコンドリアプロトン勾配との関連

Slc25a10と高い相同性を有するUCPは、ミトコンドリアの膜電位を変化させることにより熱産生を行う。そこで、Slc25a10についてもミトコンドリアのプロトン勾配について検討した。

[0102] 先ず、HEK293細胞を6wellプレートに 2×10^6 /wellの密度で播種した。24時間後、pcDNA3.1ベクターにクローニングしたSlc25a10遺伝子を、リポフェクトアミン2000を用いて、前記の細胞に導入した。また、ネガティブコントロールとしてベクターのみを導入した細胞、並びに、ポジティブコントロールとしてマウスUCP1を導入した細胞及びヒトUCP3を導入した細胞を準備した。

- [0103] 遺伝子を導入して48時間後にミトコンドリア勾配に感受性を示す試薬であるDiOC 6 (3-3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide)を用いて染色を行った。当該染色は、細胞を0.3 μ M DiOC6で20分間染色した後、PBSで2回洗浄することにより行った。なお、DiOC6は、プロトン勾配が高い場合にはミトコンドリアに結合する量が多くなり、強い蛍光を発する。一方、プロトン勾配が低い場合にはミトコンドリアに結合する量は減少し、蛍光強度は弱くなる。
- [0104] 図1(a)は、細胞内ミトコンドリアプロトン勾配をuncouplingさせるCCCP(carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone)で処理したHEK293細胞をDiOC6で染色した後の共焦点顕微鏡写真であり、図1(b)は、CCCP非処理のHEK293細胞の写真である。非処理のHEK293細胞では、細胞内ミトコンドリアが緑状のドットに染色されていることがわかる。一方、CCCP処理細胞では、蛍光強度が大きく低下していることがわかる。従って、ミトコンドリアがプロトン勾配特異的に染色されていることが確認できた。
- [0105] DiOC6の蛍光強度、すなわち、ミトコンドリアプロトン勾配の定量化は、以下の2つの方法により行った。
- [0106] (1)フローサイトメーターによる解析
DiOC6で染色した細胞をリン酸緩衝液(PBS)で洗浄した後、フローサイトメーター(Beckman Coulter社製:Epics Elite Flow Cytometer)(アルゴンレーザー:488nm、バンドパスフィルター:522nm)を用いてその蛍光強度を測定した。
- [0107] フローサイトメーターの解析結果を図2に表す。(a)はCCCPで処理したHEK293細胞を、(b)は非処理のHEK293細胞を、(c)はSlc25a10を導入したHEK293細胞を表す。図2(a)～(c)に示すとおり、Slc25a10遺伝子を導入したHEK293細胞の蛍光強度を示すヒストグラムは、コントロールと比較してシフト(蛍光強度が増加)しており、プロトン勾配が上昇したことが確認できた。表2に、それぞれの試料の蛍光強度の平均値を示す。
- [0108] [表2]

	サンプル名	平均蛍光強度
図 2 (a)	CCCP 処理	5.4
図 2 (b)	Slc25a10 遺伝子導入せず	16.8
図 2 (c)	Slc25a10 遺伝子導入	25.9

[0109] (2)フルオロメーターによる解析

DiOC6で染色した細胞をPBSで洗浄した後、溶解し、遠心分離することによって細胞抽出液を準備した。この細胞抽出液をフルオロメーター(Perseptive Biosystems社製:Cytofluor Series 4000 Fluorescent Multi Well Plate Reader) (Excitation:485nm、Emission:520nm)を用いて解析した。

[0110] ベクターのみを導入したコントロール細胞の蛍光強度を100として、各試料の相対値を求めたところ、図3に示すとおり、マウスUCP1又はヒトUCP3を導入した細胞では20%程度のプロトン勾配の低下が観察されたのに対し、マウス又はヒトSlc25a10遺伝子を導入した細胞では20%程度のプロトン勾配の上昇が観察された。この結果より、Slc25a10のプロトン勾配に対する活性はUCPとは逆の作用を有するものであり、その活性はUCPと同程度の強度であることが確認できた。

[0111] 実施例7:Slc25a10遺伝子の発現

脂肪組織、骨格筋、脾臓、肺、腎臓、脳、心臓、精巣、肝臓のmRNAがトランスファーされたノーザン解析用のメンブレン(バイオチェーン社製、クロンテック社製)を用いて、Slc25a10遺伝子の発現部位の解析を行った。ここで、プローブとして³²Pで標識されたマウスSlc25a10の全長cDNAを使用し、QuickHYB(ストラタジーン社製)を緩衝液としてハイブリダイゼーションを行った。

[0112] 図4に示すとおり、Slc25a10遺伝子は脂肪組織に非常に強く発現し、腎臓及び肝臓にも若干発現していることが確認された。

[0113] 実施例8:Slc25a10の発現抑制によるACC1の挙動

(1)脂肪酸合成におけるSlc25a10の役割

脂肪細胞への分化能を有する3T3-L1細胞を用いて、分化の前後でSlc25a10遺伝子とACC1遺伝子の発現の間に相関があるかどうかを確認した。6ウェルプレー

トに3T3-L1細胞を播種し、2日後にコンフルエントになったところで、インスリン、デキサメタゾン及びIBMX(3-イソブチル-1-メチルキサンチン)を含む分化誘導培地にて脂肪細胞へと分化させた。分化から2日後及び4日後に、それぞれsiRNA(M8)で3時間、Slc25a10の発現抑制を行った。分化8日後に相関を調べた。図5(a)及び(b)に示すように、3T3-L1を脂肪に分化させた場合に、Slc25a10遺伝子及びACC1遺伝子のいずれについても、その発現量が増加することが確認できた。ACC1の発現の増加は脂肪酸合成が亢進していることの指標となることから、脂肪酸合成の亢進とSlc25a10の発現との間に密接な関係があることが確認できた。

[0114] (2) siRNAのトランスフェクション及び定量的RT-PCR

先ず、サイレンサーsiRNAコンストラクションキット(アンビオン社製)を用いてsiRNAを合成した。次に、ヒト又はマウスのSlc25a10に最適な配列を決定するため、それぞれ12種の配列をSlc25a10の発現抑制を指標に検討した。各siRNAをトランスフェクトした細胞における、Slc25a10遺伝子の相対発現量を図6(a)及び(b)に示す。この結果から、以後の実験にはsiRNAとしてH4、H10及びM8を用いることとした。

[0115] 各siRNAの配列は以下のとおりである。「ポジション」は、ヒトSlc25a10遺伝子(NM_012140)においてそのsiRNAがどの核酸番号の位置に該当するかを示す。

H1(ポジション 186)

センス: AACTGCGTCTGCAGATGCACCCCTGTCTC (配列番号3)

アンチセンス: AAGGTGCATCTGCAGACGCAGCCTGTCTC (配列番号4)

H2(ポジション 465)

センス: AAGTCGTTCTGCATCCTGACGCCTGTCTC (配列番号5)

アンチセンス: AACGTCAGGATGCAGAACGACCCTGTCTC (配列番号6)

H3(ポジション 513)

センス: AAATCCAGCGCATGGGCGTAGCCTGTCTC (配列番号7)

アンチセンス: AACTACGCCCATGCGCTGGATCCTGTCTC (配列番号8)

H4(ポジション 556)

センス: AAACAGTCTCCTGAGACCCTCCCTGTCTC (配列番号9)

アンチセンス: AAGAGGGTCTCAGGAGACTGTCCTGTCTC (配列番号10)

H5(ポジション 651)

センス: AAGGTGCTAAGGACCAGCTGCCCTGTCTC (配列番号11)

アンチセンス: AGCAGCTGGTCCTTAGCACCCCTGTCTC (配列番号12)

H6(ポジション 780)

センス: AACTGATACTCCCCCTTGGAGCCTGTCTC (配列番号13)

アンチセンス: AACTCCAAGGGGGAGTATCAGCCTGTCTC (配列番号14)

H7(ポジション 945)

センス: AAGGCTGGTCAGGATGGCACTCCTGTCTC (配列番号15)

アンチセンス: AAAGTGCCATCCTGACCAGCCCCTGTCTC (配列番号16)

H8(ポジション 1010)

センス: AAGTGCTGGGCTTGGGACTCTCCTGTCTC (配列番号17)

アンチセンス: AAAGAGTCCCAAGCCCAGCACCCCTGTCTC (配列番号18)

H9(ポジション 1315)

センス: AAGTGCTGGAAGATGCTGCTCCTGTCTC (配列番号19)

アンチセンス: AAAGTGCTGGAAGATGCTGCTCCTGTCTC (配列番号20)

H10(ポジション 1426)

センス: AAGAGGACATGGAAGGTCTGGCCTGTCTC (配列番号21)

アンチセンス: AACCAGACCTTCCATGTCCTCCCTGTCTC (配列番号22)

H11(ポジション 1634)

センス: AAGCTGGTGAGTGGAGAGGCTCCTGTCTC (配列番号23)

アンチセンス: AAAGCCTCTCCACTCACCAGCCCTGTCTC (配列番号24)

H12(ポジション 1870)

センス: AAAGCTCCCGGCATTTATTGACCTGTCTC (配列番号25)

アンチセンス: AATCAATAAATGCCGGGAGCTCCTGTCTC (配列番号26)。

[0116] 同様に、マウスSlc25a10遺伝子(NM_013770)に対するsiRNAの塩基配列を以下に示す。

M1(ポジション 209)

センス: AATTGGGTCTGCAAATGCACCCCTGTCTC (配列番号27)

アンチセンス: AAGGTGCATTTGCAGACCCAACCTGTCTC (配列番号28)

M2(ポジション 358)

センス: AATCCCGCATGGTCTCGTAGACCTGTCTC (配列番号29)

アンチセンス: AATCTACGAGACCATGCGGGACCTGTCTC (配列番号30)

M3(ポジション 488)

センス: AAGTCGTTCTGCATCCTGACACCTGTCTC (配列番号31)

アンチセンス: AATGTCAGGATGCAGAACGACCCTGTCTC (配列番号32)

M4(ポジション 536)

センス: AAATCCAGGGCATGAGAGTAGCCTGTCTC (配列番号33)

アンチセンス: AACTACTCTCATGCCCTGGATCCTGTCTC (配列番号34)

M5(ポジション 674)

センス: AAAGTGCTGAGGACCAGTTGCCCTGTCTC (配列番号35)

アンチセンス: AAGCAACTGGTCCTCAGCACTCCTGTCTC (配列番号36)

M6(ポジション 788)

センス: AAGGAGTTCATCAGGCGAGTCCCTGTCTC (配列番号37)

アンチセンス: AAGACTCGCCTGATGAACTCCCCTGTCTC (配列番号38)

M7(ポジション 968)

センス: AAATGTCAGGTGGTTGGCACTCCTGTCTC (配列番号39)

アンチセンス: AAAGTGCCAACCACCTGACATCCTGTCTC (配列番号40)

M8(ポジション 1159)

センス: AAGTGGCACCTCTGCCCTACTCCTGTCTC (配列番号41)

アンチセンス: AAAGTAGGGCAGAGGTGCCACCCTGTCTC (配列番号42)

M9(ポジション 1312)

センス: AAAGCAGGAAACGAACTCGGCCCTGTCTC (配列番号43)

アンチセンス: AAGCCGAGTTCGTTTCCTGCTCCTGTCTC (配列番号44)

M10(ポジション 1481)

センス: AACTCTCCTGAAGGCACTACCCCTGTCTC (配列番号45)

アンチセンス: AAGGTAGTGCCTTCAGGAGAGCCTGTCTC (配列番号46)

M11(ポジション 1661)

センス: AAGTGTGAGGGACACAGACAGCCTGTCTC (配列番号47)

アンチセンス: AACTGTCTGTGTCCCTCACACCCTGTCTC (配列番号48)

M12(ポジション 1827)

センス: AATTGAGGGAAAACAGGCTGCCCTGTCTC (配列番号49)

アンチセンス: AAGCAGCCTGTTTTCCCTCAACCTGTCTC (配列番号50)。

[0117] 次に、siRNAを導入した細胞を準備した。siRNAのトランスフェクションに際して、6穴プレートに 2×10^4 細胞/wellの濃度で播種した。24時間後、siRNA(H4又はH10)をオリゴフェクタミン(Oligofectamine: インビトロジェン社製)を用いて細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの2日後、細胞を回収し、RNeasy(キアゲン社製)を用いてRNAを調製した。調製したRNAから定量的RT-PCR(アプライドバイオシステム社製)によりcDNAを調製し、Slc25a10及びACC1の発現量を定量した。

[0118] 図7(a)及び(b)に示すように、RNAiによりSlc25a10遺伝子の発現を抑制した場合に、ACC1遺伝子の発現もそれに比例して抑制されることが確認できた。

[0119] 実施例9: Slc25a10の強制発現によるACC1の挙動

次に、Slc25a10遺伝子を強制発現させ、HEK293細胞における発現を増加させた場合にACC1の発現がどのような挙動を示すかを検討した。

[0120] 先ず、Slc25a10の発現ベクターを、ヒトSlc25a10遺伝子をpcDNA3.1(インビトロジェン社製)にクローニングすることにより調製した。この発現ベクターをHEK293細胞にトランスフェクションし、安定的にSlc25a10を発現する細胞株(H19クローン及びH41クローン)を樹立した。当該細胞株(10^6 細胞)からRNAを調製し、調製したRNAから定量的RT-PCRによりSlc25a10及びACC1の発現レベルを測定した。図8に示すように、Slc25a10遺伝子を強制発現させた場合、対照と比較してACC1遺伝子の発現も増加していることが確認できた。

[0121] 実施例10: Slc25a10の発現によるマロニルCoA量の挙動

10^7 細胞/dishの濃度で培養したHepG2細胞をトリプシン処理し、遠心分離することにより細胞を回収した。得られた細胞のペレットにトリクロロ酢酸(10%:800 μ L)を

加え、3000rpmで10分間遠心分離することにより可溶化画分を抽出した。マロニルCoAの部分精製のために、抽出物を逆相クロマトグラフィー(Sep-Pak C18)で精製した。得られた溶出液を乾燥させた後、100 μ Lの水に溶解した。マロニルCoA(50 μ L)を含む試料を脂肪酸シンセース(fatty acid synthase)及び放射線標識したアセチルCoAと反応させ、脂肪酸を合成した。脂肪酸を石油エーテルで抽出し、放射線標識された脂肪酸の放射活性をシンチレーションカウンターにより測定した。

[0122] 図9に示すように、Slc25a10遺伝子の発現を抑制した場合に、マロニルCoAの生成量は低下することが確認できた。また、脂肪酸の生成は、通常、マロニルCoAと比例的な挙動を示すことから、Slc25a10遺伝子の発現と脂肪酸の生成量との間にも同様の関係があるものと考えられた。

[0123] 実施例11:脂肪蓄積の同定

3T3-L1細胞を用いて、脂肪の蓄積を解析した。

6ウェルプレートに3T3-L1細胞を播種し、2日後にコンフルエントになったところで、インスリン、デキサメタゾン及びIBMX(3-イソブチル-1-メチルキサンチン)を含む分化誘導培地にて脂肪細胞へと分化させた。分化から2日後及び4日後に、それぞれsiRNA(M8)で3時間、Slc25a10の発現抑制を行った。分化から8日後に、蓄積した脂肪を0.175%のオイルレッドOで染色し、PBSで洗浄した。図10は、脂肪細胞に分化した3T3-L1細胞の顕微鏡である。

[0124] また、脂肪の蓄積量を定量するため、染色した脂肪細胞を1mLのプロパノールで処理し、蓄積した脂肪を溶出させた。各細胞における脂肪の蓄積量の定量結果を図11に示す。図10及び11に示した結果から明らかなように、RNAiでSlc25a10の発現抑制を行ったところ、脂肪の蓄積量が減少した。

産業上の利用可能性

[0125] 以上説明したように、本発明の化合物の評価方法又は検査方法によれば、肥満の治療薬のスクリーニング等、化合物の評価方法を提供することが可能となる。また、分子レベルで判断可能な肥満の検査方法を提供することが可能となる。従って、抗肥満薬の開発や臨床における肥満の診断など、生活習慣病を一例とする医療の分野において、新たな医薬や診療形態を提供することが可能となる。

[0126] また、本発明によれば、長鎖脂肪鎖伸長酵素活性を抑制する活性を有する物質（例えば、siRNA、低分子化合物、タンパク質、抗体など）を用いた代謝系疾患、循環器系疾患、中枢神経系疾患などの治療・予防方法を提供することが可能となり、また、かかる物質を含有する治療・予防剤を提供することが可能となる。代謝系疾患としては、例えば、肥満症、糖尿病、ホルモン分泌異常、高脂血症、通風、脂肪肝などが挙げられる。循環器疾患としては、例えば、狭心症、急性・うつ血性心不全、心筋梗塞、冠状動脈硬化症、高血圧、腎臓病、電解質異常などが挙げられる。中枢神経系疾患としては、過食症などが挙げられる。

請求の範囲

- [1] 被検化合物を、被検動物又は被検細胞に、投与又は接触させる工程と、
該被検動物又は該被検細胞中でSlc25a10遺伝子あるいは該遺伝子と機能的に
等価な遺伝子の発現レベルの変化を検出する工程と、
を含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。
- [2] 被検化合物を、Slc25a10遺伝子の発現調節領域とレポーター遺伝子との融合遺
伝子を有する被検動物又は被検細胞に投与又は接触させる工程と、
該レポーター遺伝子の被検動物又は被検細胞中での発現レベルの変化を検出す
る工程と、
を含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。
- [3] 前記発現レベルの変化が発現レベルの低下であることを特徴とする請求項1又は2
に記載の化合物の評価方法。
- [4] ACC1の発現量、マロニルCoA存在量及び脂肪酸存在量のうち少なくとも一つの
変化を検出する工程をさらに含むことを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記
載の化合物の評価方法。
- [5] 被検化合物を、被検動物又は被検細胞に、投与又は接触させる工程と、
該被検化合物が、Slc25a10タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する
工程と、
を含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。
- [6] 被検化合物を、Slc25a10タンパク質に接触させる工程と、
該被検化合物が、該タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する工程と、
を含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。
- [7] 請求項1～6のいずれか一項に記載の評価方法によって得られた化合物を有効成
分として含有することを特徴とする肥満の治療又は予防剤。
- [8] Slc25a10遺伝子の発現量を低下させることを特徴とする脂肪酸合成阻害方法。
- [9] Slc25a10遺伝子の発現量をRNAiにより低下させることを特徴とする脂肪酸合成
阻害方法。
- [10] 前記RNAiが、配列番号3及び4に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号5及び6

に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号7及び8に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号9及び10に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号11及び12に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号17及び18に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号21及び22に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号23及び24に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号25及び26に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号27及び28に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号29及び30に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号31及び32に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号35及び36に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号37及び38に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号39及び40に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号41及び42に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号43及び44に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号45及び46に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号47及び48に記載の核酸からなるsiRNA及び配列番号49及び50に記載の核酸からなるsiRNAからなる群から選択される一以上のsiRNAを使用したものであることを特徴とする請求項9に記載の脂肪酸合成阻害方法。

- [11] 前記RNAiが配列番号9及び10に記載の核酸からなるsiRNAを使用したものであることを特徴とする請求項9に記載の脂肪酸合成阻害方法。
- [12] 前記RNAiが配列番号41及び42に記載の核酸からなるsiRNAを使用したものであることを特徴とする請求項9に記載の脂肪酸合成阻害方法。
- [13] Slc25a10遺伝子の発現量を低下させる工程を含むことを特徴とする肥満の治療又は予防方法。
- [14] Slc25a10遺伝子の発現量をRNAiにより低下させることを特徴とする肥満の治療又は予防方法。
- [15] 前記RNAiが、配列番号3及び4に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号5及び6に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号7及び8に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号9及び10に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号11及び12に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号17及び18に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号21及び22に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号23及び24に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号25及び26に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号27及び28に

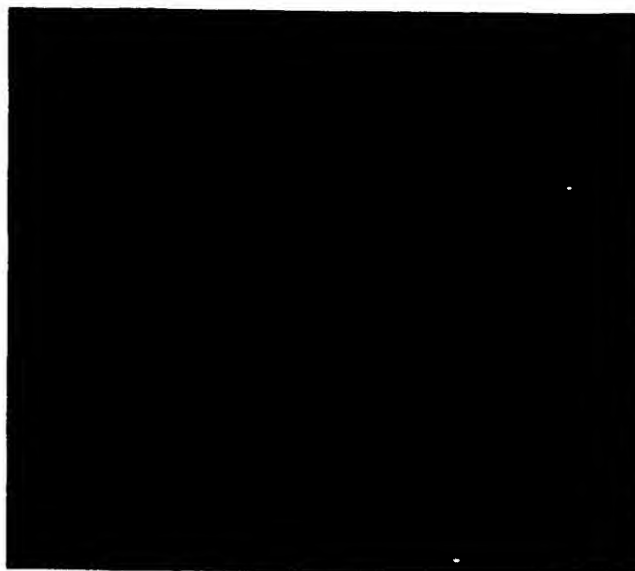
記載の核酸からなるsiRNA、配列番号29及び30に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号31及び32に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号35及び36に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号37及び38に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号39及び40に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号41及び42に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号43及び44に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号45及び46に記載の核酸からなるsiRNA、配列番号47及び48に記載の核酸からなるsiRNA及び配列番号49及び50に記載の核酸からなるsiRNAからなる群から選択される一以上のsiRNAを使用したものであることを特徴とする請求項14に記載の肥満の治療又は予防方法。

- [16] 前記RNAiが配列番号9及び10に記載の核酸からなるsiRNAを使用したものであることを特徴とする請求項14に記載の肥満の治療又は予防方法。
- [17] 前記RNAiが配列番号41及び42に記載の核酸からなるsiRNAを使用したものであることを特徴とする請求項14に記載の肥満の治療又は予防方法。
- [18] 被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10遺伝子の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする肥満の検査方法。
- [19] 被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10タンパク質の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする肥満の検査方法。
- [20] 被検組織又は被検細胞において、Slc25a10遺伝子の発現レベル又はSlc25a10タンパク質の活性を変化させた際に、該変化によって生じる脂肪酸合成に關与する物質の変化量を測定することを特徴とする肥満の検査方法。
- [21] 被検組織又は被検細胞におけるSlc25a10遺伝子に存在する多型を検出することを特徴とする肥満の検査方法。
- [22] Slc25a10タンパク質と相互作用することにより、Slc25a10遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量又は該タンパク質の活性を検出することを特徴とする肥満の検査方法。
- [23] 配列番号9及び10に記載の核酸からなることを特徴とするsiRNA。
- [24] 請求項23に記載のsiRNAを含むことを特徴とするSlc25a10発現抑制剤。
- [25] 請求項23に記載のsiRNAを含むことを特徴とする脂肪酸合成抑制剤。

- [26] 請求項23に記載のsiRNAを含むことを特徴とする肥満の治療又は予防剤。
- [27] 配列番号41及び42に記載の核酸からなることを特徴とするsiRNA。
- [28] 請求項27に記載のsiRNAを含むことを特徴とするSlc25a10発現抑制剤。
- [29] 請求項27に記載のsiRNAを含むことを特徴とする脂肪酸合成抑制剤。
- [30] 請求項27に記載のsiRNAを含むことを特徴とする肥満の治療又は予防剤。

【図1】

(a)

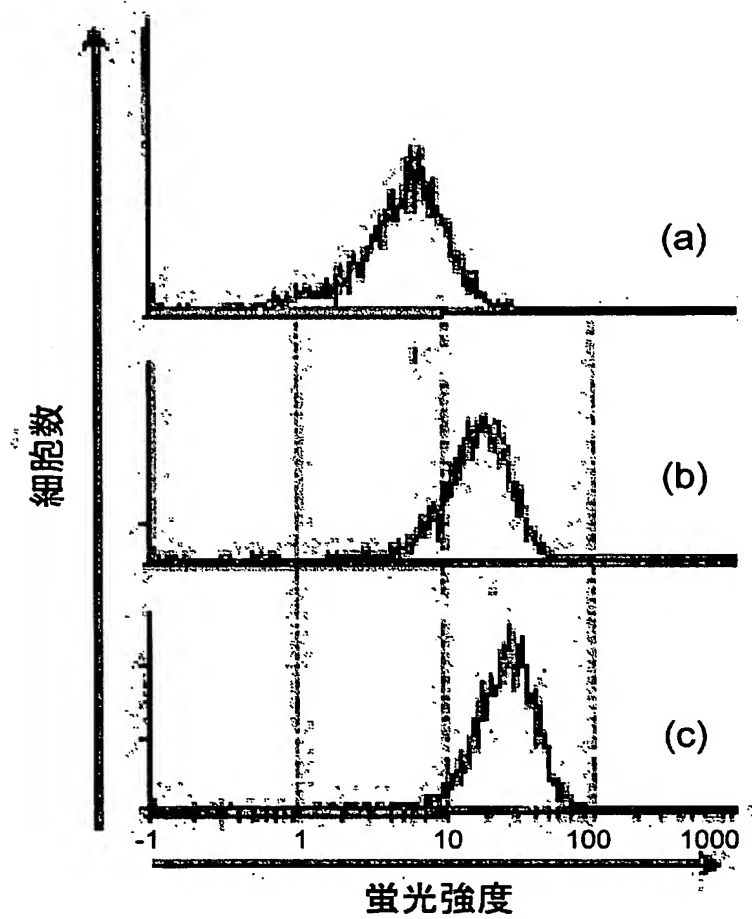


(b)

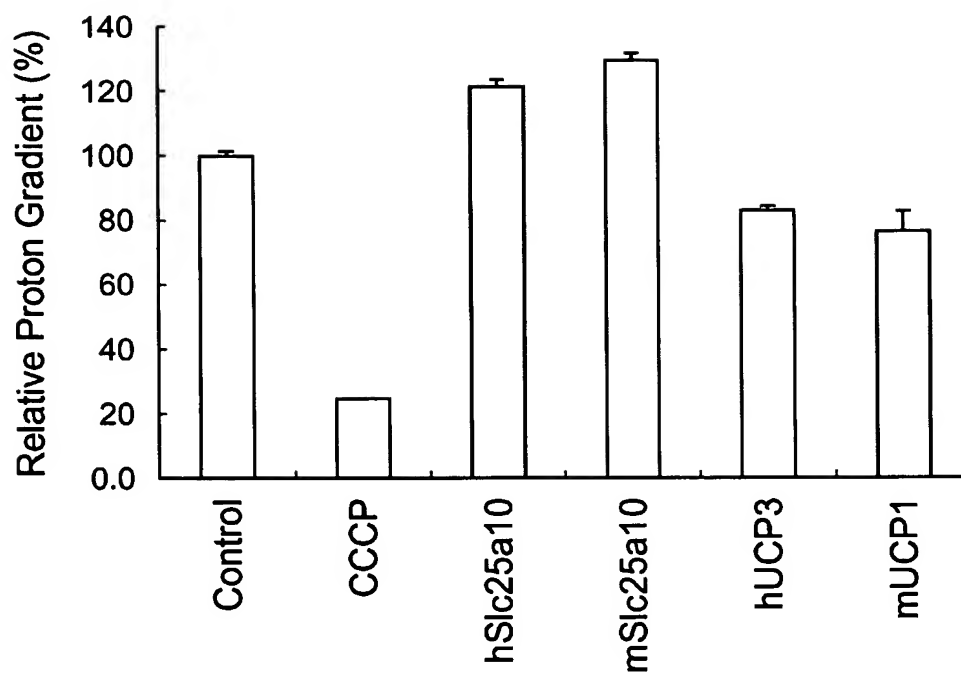


BEST AVAILABLE COPY

[図2]

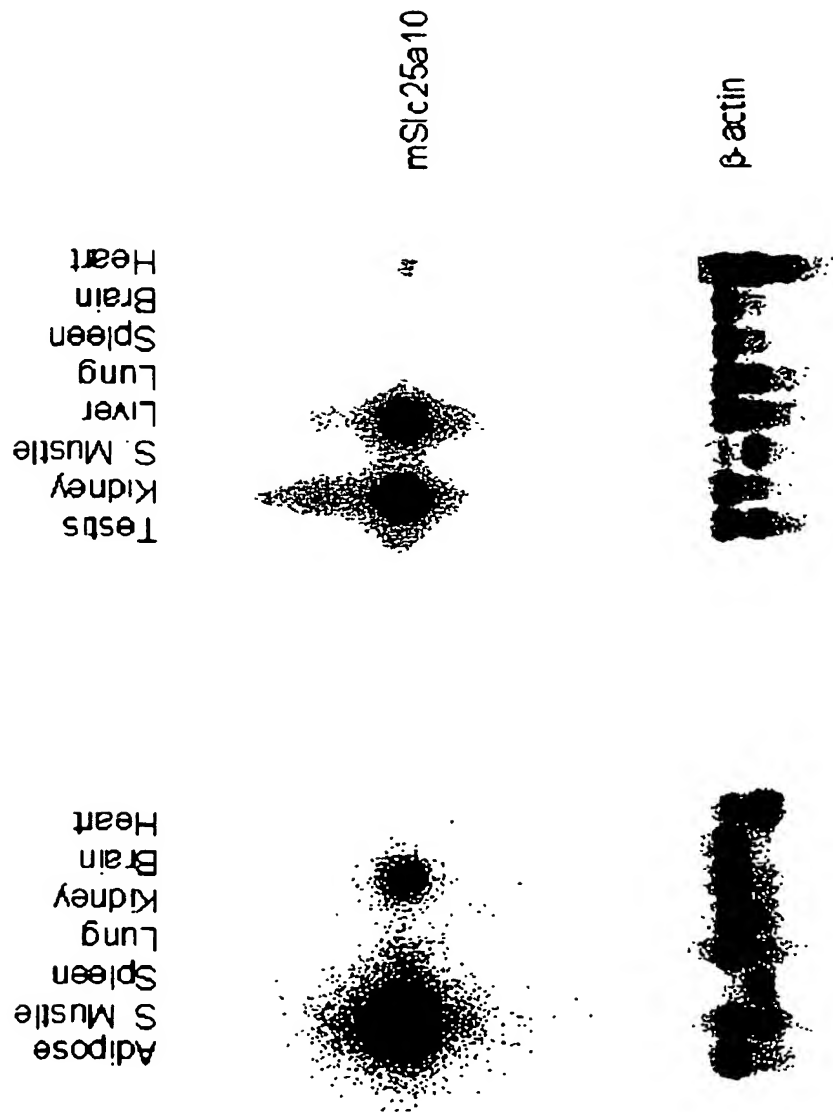


[図3]



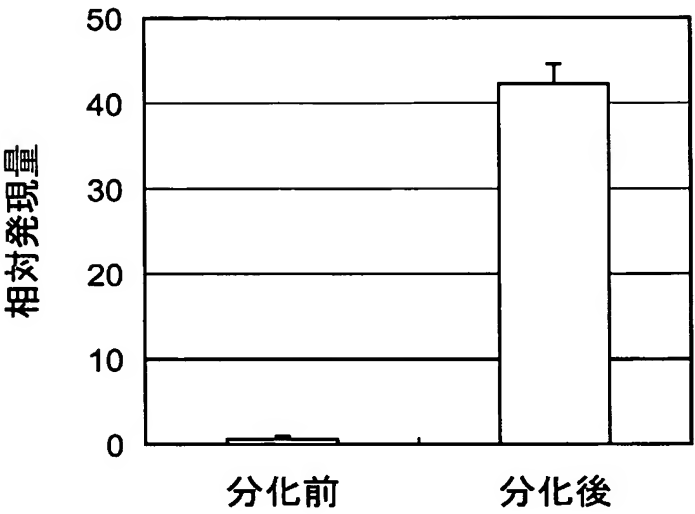
BEST AVAILABLE COPY

【図4】

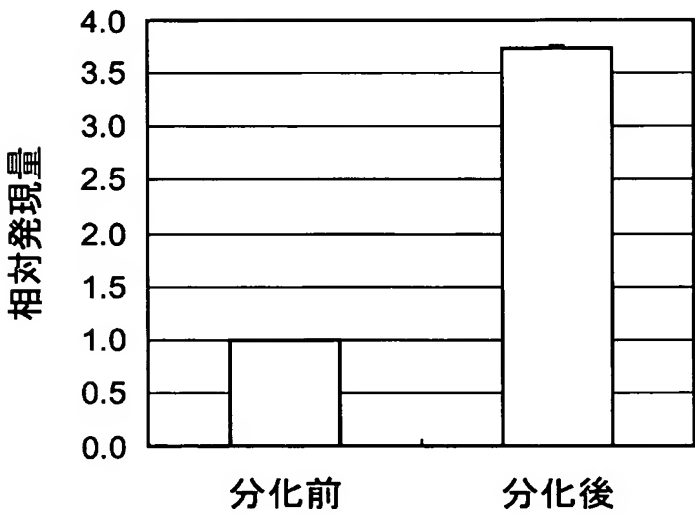


[図5]

(a) Slc25a10

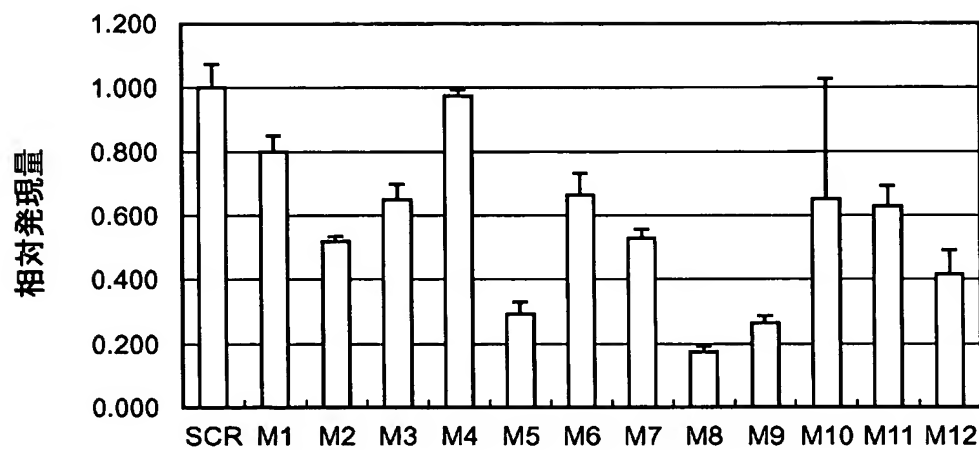


(b) ACC1

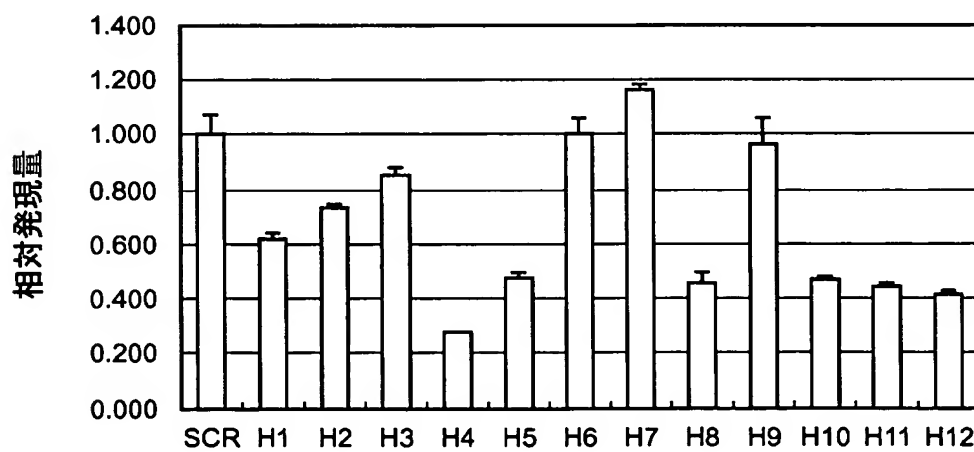


[図6]

(a) マウス

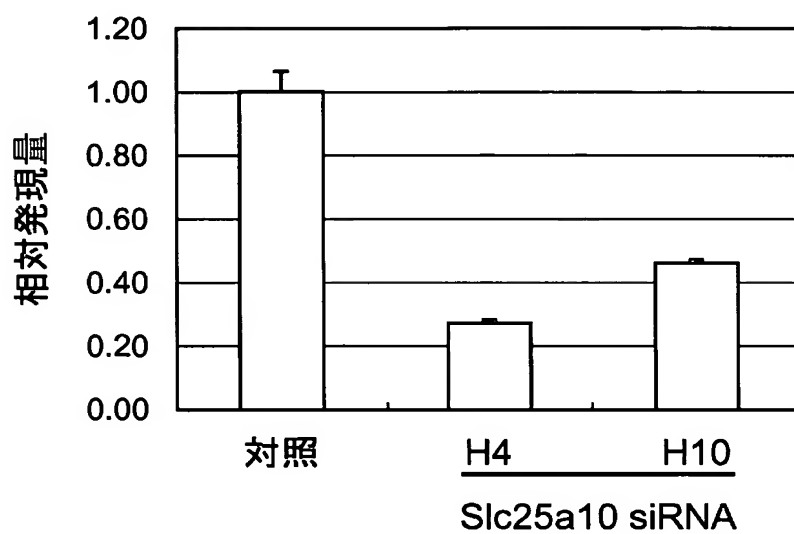


(b) ヒト

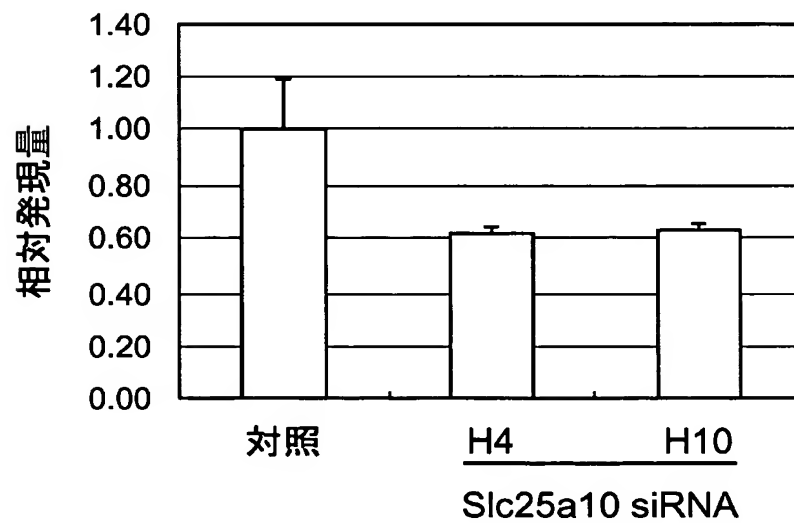


[図7]

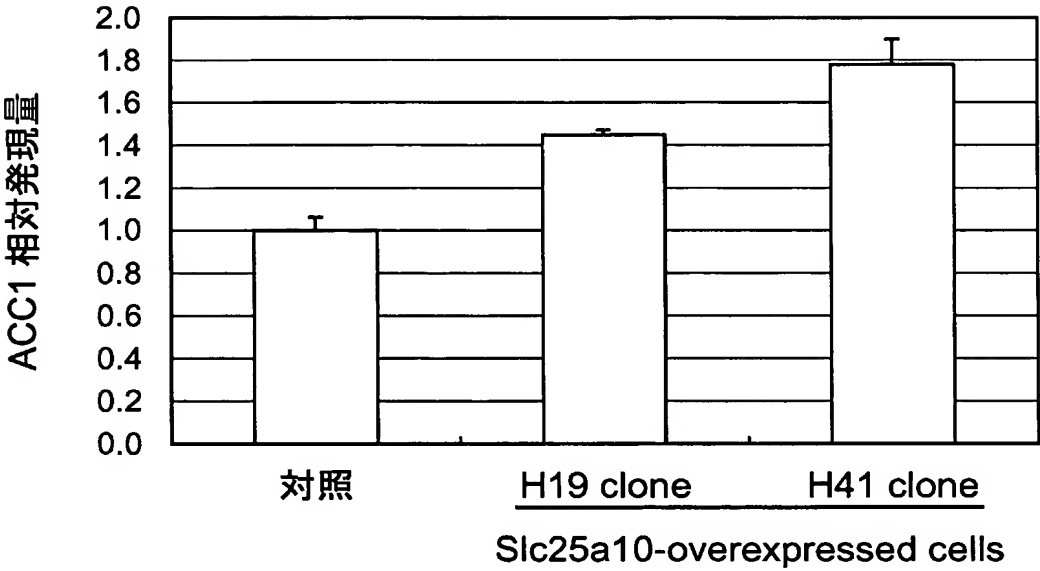
(a) Slc25a10



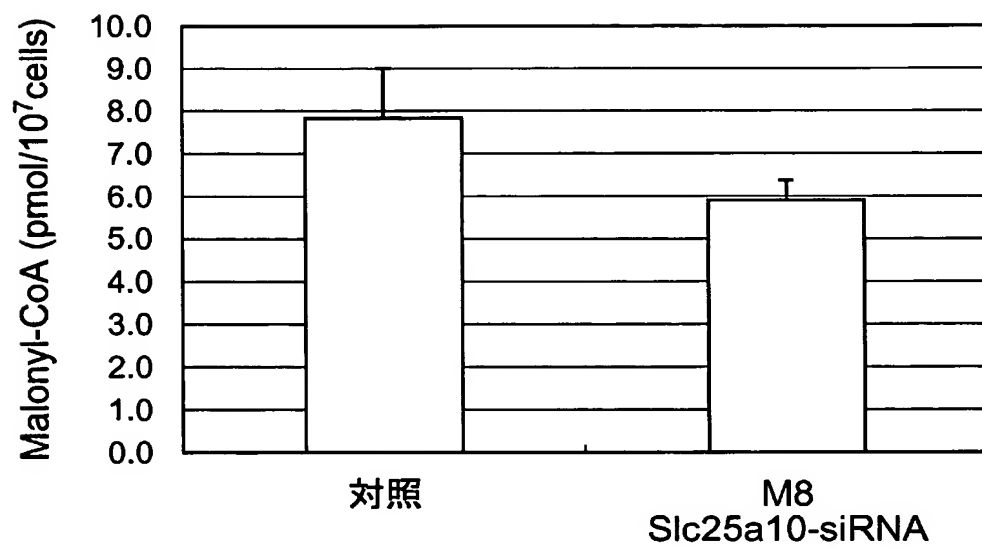
(b) ACC1



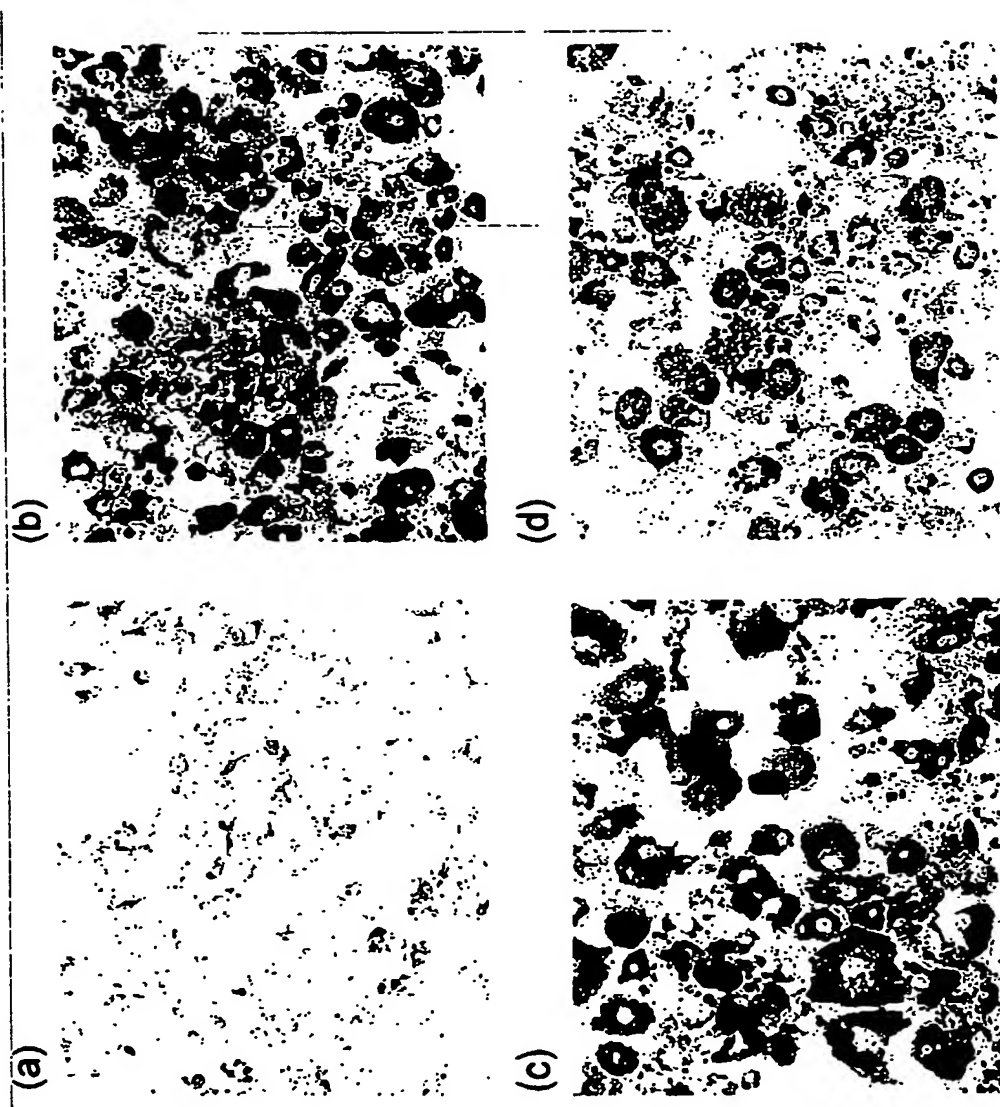
[図8]



[図9]

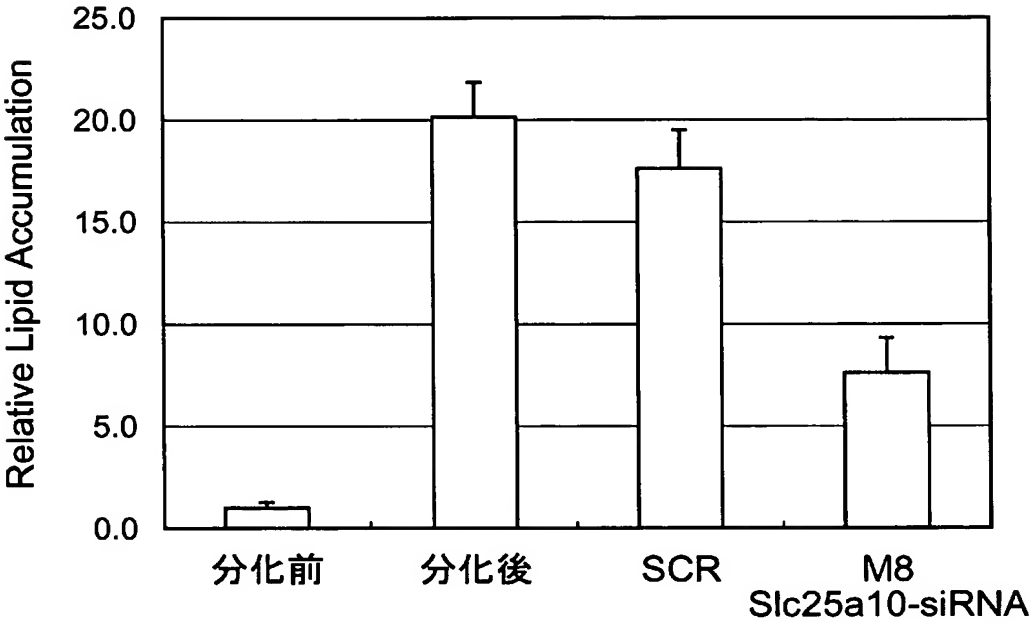


【図10】



BEST AVAILABLE

[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/010664

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12Q1/02, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50, A61P3/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12Q1/02, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTplus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Fiermonte G. et al., The Sequence, bacterial expression, and functional reconstitution of the rat mitochondrial dicarboxylate transporter cloned via distant homologs in yeast and Caenorhabditis elegans, J.Biol.Chem., 1998, Vol.273, No.38, pages 24754 to 24759	1-2, 5-6, 18-19, 21-22/ 3-4, 8-12, 20, 23-30
Y/A	Fiermonte G. et al., Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family, Biochem.J., 1999, Vol.344, pages 953 to 960	1-2, 5-6, 18-19, 21-22/ 3-4, 8-12, 20, 23-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 August, 2004 (12.08.04)

Date of mailing of the international search report
31 August, 2004 (31.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/010664

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Das K. et al., Predominant expression of the mitochondrial dicarboxylate carrier in white adipose tissue, Biochem. J., 1999, Vol.344, pages 313 to 320	1-2, 5-6, 18-19, 21-22/ 3-4, 8-12, 20, 23-30
Y/A	WO 99/64458 A1 (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY), 16 December, 1999 (16.12.99), & AU 9945482 A	1-2, 5-6, 18-19, 21-22/ 3-4, 8-12, 20, 23-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/010664

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13-17

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in the above claims relate to methods for treatment of the human body by therapy and diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. ☒ Claims Nos.: 7

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the "compound" in the above claim, no specific "compound" but merely a general screening method is presented in the description. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/010664

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

what specific compounds are involved. Thus, the above claim is described in an unclear manner and, therefore, no meaningful international search can be made thereon.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl7 C12Q1/68, C12Q1/02, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50, A61P3/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl7 C12Q1/68, C12Q1/02, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTplus/JST7580(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	Fiermonte G. et al., The sequence, bacterial expression, and functional reconstitution of the rat mitochondrial dicarboxylate transporter cloned via distant homologs in yeast and Caenorhabditis elegans, J Biol Chem, 1998, Vol. 273, No. 38, pp. 24754-24759	1-2, 5-6, 18-19, 21-22/3-4, 8-12, 20, 23-30
Y/A	Fiermonte G. et al., Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family, Biochem J, 1999, Vol. 344, pp. 953-960	1-2, 5-6, 18-19, 21-22/3-4, 8-12, 20, 23-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.08.2004

国際調査報告の発送日

31.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

七條 里美

4 B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	Das K. et al., Predominant expression of the mitochondrial dicarboxylate carrier in white adipose tissue, Biochem J, 1999, Vol. 344, pp. 313-320	1-2, 5-6, 18-19, 21-22/3-4, 8-12, 20, 23-30
Y/A	WO 99/64458 A1 (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY) 1999. 12. 16 & AU 9945482 A	1-2, 5-6, 18-19, 21-22/3-4, 8-12, 20, 23-30

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT 17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13-17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
前記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療のための処置及び診断方法に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。
2. ☒ 請求の範囲 7 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
前記請求の範囲の「化合物」について、明細書には、一般的なスクリーニング方法が記載されているのみであり、具体的な「化合物」については何ら記載されていない。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのようなものが包含されるのか全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は不明確であり、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。